



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109917141 A

(43)申请公布日 2019.06.21

(21)申请号 201910210018.7

(22)申请日 2019.03.19

(71)申请人 迪佰(厦门)生物科技有限公司

地址 361000 福建省厦门市海沧区翁角西路2074号生物医药产业园B13号楼第7层02单元

(72)发明人 钟乾兴 肖江群 王保丹

(74)专利代理机构 北京超凡宏宇专利代理事务所(特殊普通合伙) 11463

代理人 曹桓

(51)Int.Cl.

G01N 33/80(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

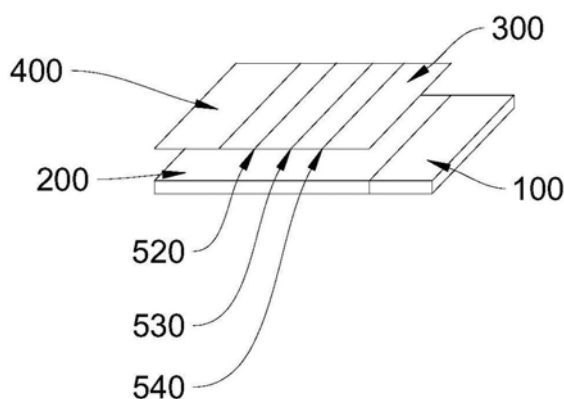
(54)发明名称

一种检测人ABO血型试纸条、制备方法、检测方法及应用

(57)摘要

一种检测人ABO血型试纸条、制备方法、检测方法及应用,生物医药领域,包括聚酯板以及与其聚酯板上边缘粘结的吸水纸,在聚酯板上表面沿层析方向依次铺设有样品垫和预先包被好抗A、抗B和抗RBC的硝酸纤维素膜,且硝酸纤维素膜的上边缘与吸水纸的下边缘搭接,样品垫上铺设有溶血剂和细胞膜荧光染料。本发明提供一种检测人ABO血型试纸条的制备方法,通过该制备方法能制备出血型检测配套试剂不需低温保存,操作简单,灵敏度高的试纸条。此外,还提供一种检测人ABO血型的试纸条,该试纸条可以在短时间内完成多个抗原项目的联合检测,操作简便快捷,对操作人员专业技术水平要求低,适合于临床检测,快速获得检测结果。

600



1. 一种检测人ABO血型的试纸条,其特征在于,包括聚酯板以及与聚酯板上边缘粘结的吸水纸,在所述聚酯板上表面沿层析方向依次铺设有样品垫和预先包被好抗A、抗B和抗RBC的硝酸纤维素膜,且所述硝酸纤维素膜的上边缘与所述吸水纸的下边缘搭接,所述硝酸纤维素膜的下边缘与所述样品垫的上边缘粘接,所述样品垫上铺设有溶血剂和细胞膜荧光染料。

2. 根据权利要求1所述的检测人ABO血型的试纸条,其特征在于,所述溶血剂为表面活性剂,优选的,所述表面活性剂包括Triton X-100,所述Triton X-100的浓度为0.05-1%,优选浓度0.1%,所述Triton X-100在一根试纸条上的添加量为30-60ul;

优选的,所述Triton X-100在一根试条上的添加量为40ul。

3. 根据权利要求1所述的检测人ABO血型的试纸条,其特征在于,所述细胞膜荧光染料为长链二烷基羰花青化合物DiO水溶液,所述长链二烷基羰花青化合物DiO水溶液的浓度为0.1-1.5‰;

优选的,所述长链二烷基羰花青化合物DiO水溶液的浓度为1.0‰。

4. 根据权利要求1所述的检测人ABO血型的试纸条,其特征在于,所述试纸条外端组装有卡壳,所述卡壳下方开设有加样孔。

5. 一种如权利要求1-4任一项所述的检测人ABO血型的试纸条的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 提供吸水纸、包被有抗A、抗B和抗RBC的硝酸纤维素膜以及铺设有溶血剂和细胞膜荧光染料的样品垫;

(2) 将所述吸水纸、所述硝酸纤维素膜以及所述样品垫依次铺设在聚酯板上,以形成检测试纸条大板。

6. 根据权利要求5所述的检测人ABO血型的试纸条的制备方法,其特征在于,所述步骤(2)还包括,将所述检测试纸条大板用切刀机分切成预设规格的试纸条初品,将所述试纸条初品与对应规格的带有加样窗口的卡壳组装形成检测人ABO血型试纸条。

7. 根据权利要求5所述的检测人ABO血型的试纸条的制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中硝酸纤维素膜上的抗体采用包被缓冲液进行包被,所述抗体的包被浓度为1-5mg/mL,所述包被缓冲液包括磷酸缓冲液和蔗糖,所述磷酸缓冲液的浓度为10-50mmol, pH为7.2-7.5,所述蔗糖的浓度为0.8-1.5%;

优选的,所述磷酸缓冲液的浓度为30mmol, pH为7.5,所述蔗糖的浓度为1%。

8. 一种使用如权利要求1-4任一项所述的试纸条的检测人ABO血型的方法,其特征在于,包括如下步骤:在加样孔中加入全血样本5-10μL,待样本与样品垫充分接触后,滴加1-3滴10mmol, pH7.4的PBS样本冲洗液,12-15分钟后,在484nm波长下的激发光下,即可检测到501nm发射光信号。

9. 根据权利要求8所述的检测人ABO血型的方法,其特征在于,所述检测人ABO血型的方法包括将所述试纸条插入配套的免疫荧光检测仪进行检测。

10. 一种人ABO血型检测试剂盒,其特征在于,包括如权利要求8所述的试纸条和样本冲洗液。

一种检测人ABO血型试纸条、制备方法、检测方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域,具体而言,涉及一种检测人ABO血型试纸条、制备方法、检测方法及应用。

背景技术

[0002] 根据红细胞表面有无特异性抗原(凝集原)A和B来划分的血液类型系统。ABO血型系统是根据凝集原A、B的分布把血液分为A、B、AB、O四型。红细胞上只有凝集原A的为A型血,其血清中有抗B凝集素;红细胞上只有凝集原B的为B型血,其血清中有抗A的凝集素;红细胞上A、B两种凝集原都有的为AB型血,其血清中无抗A、抗B凝集素;红细胞上A、B两种凝集原皆无者为O型,其血清中抗A、抗B凝集素皆有。具有凝集原A的红细胞可被抗A凝集素凝集;抗B凝集素可使含凝集原B的红细胞发生凝集。人体血液红细胞上有Rh抗原(又称D抗原)的,称为Rh阳性。这样就使已发现的红细胞A、B、O及AB四种主要血型的人,又都分别一分为二地被划分为Rh阳性和阴性两种。

[0003] 目前常用的血型检测方法有混合凝集法、微柱凝胶法、层析凝集法等,这些方法均利用抗原抗体免疫凝集反应来实现血型检测。现有技术存在以下缺陷,其中,混合凝集法的配套试剂需低温保存;微柱凝胶法的试剂操作比较麻烦,需要离心;层析凝集法灵敏度低,容易漏检等问题。

[0004] 此外,现有技术对操作人员专业技术水平要求较高。

[0005] 鉴于此,特提出本发明。

发明内容

[0006] 本发明的第一目的在于提供一种检测人ABO血型试纸条的制备方法,通过该制备方法能制备出血型检测配套试剂不需低温保存,操作简单,灵敏度高的试纸条。

[0007] 本发明的第二目的在于提供一种检测人ABO血型的试纸条,该试纸条可以在15分钟内在一根试条上完成多个抗原项目的联合检测,操作简便快捷,对操作人员专业技术水平要求低,适合于临床检测,快速获得检测结果。本发明还可配合仪器检测,避免人为判读带来的误判。

[0008] 本发明的第三目的在于提供一种检测人ABO血型的试纸条的检测方法,该检测方法操作简便快捷,对操作人员专业技术水平要求低。

[0009] 本发明的第四目的在于提供一种检测人ABO血型检测试剂盒,该试剂盒检测灵敏度高,可以配合仪器检测,避免人为判读带来的误判。

[0010] 一种检测人ABO血型的试纸条,包括聚酯板以及与聚酯板上边缘粘结的吸水纸,在聚酯板上表面沿层析方向依次铺设有样品垫和预先包被好抗A、抗B和抗RBC的硝酸纤维素膜,且硝酸纤维素膜的上边缘与吸水纸的下边缘搭接,硝酸纤维素膜的下边缘与样品垫的上边缘粘接,样品垫上铺设有溶血剂和细胞膜荧光染料。

[0011] 在本发明应用较佳的实施例中,上述溶血剂为表面活性剂,优选的,表面活性剂包

括Triton X-100,Triton X-100的浓度为0.05-1%,优选浓度0.1%,Triton X-100在一根试纸条上的添加量为30-60ul;

[0012] 优选的,Triton X-100在一根试纸条上的添加量为40ul。

[0013] Triton X-100(聚乙二醇辛基苯基醚)是一种非离子型表面活性剂(或称去污剂)。分子量为646.86(C₃₄H₆₂O₁₁)。Triton X-100能溶解脂质使红细胞膜破碎并释放血红蛋白,从而使破碎的红细胞膜可以通过层析作用经过硝酸纤维素膜;本发明还通过使用Triton X-100的浸润作用,破坏待测血样中红细胞的细胞膜通透性,从而有利于红细胞上的凝集原A、凝集原B和Rh抗原分别与试纸条硝酸纤维素膜上的预先包被抗A、抗B和抗RBC快速特异性结合,从而加快检测的速度;本发明中Triton X-100还可辅助DiO的溶解。

[0014] 在本发明应用较佳的实施例中,上述细胞膜荧光染料为长链二烷基羰花青化合物DiO水溶液,长链二烷基羰花青化合物DiO水溶液的浓度为0.1-1.5%;

[0015] 优选的,长链二烷基羰花青化合物DiO水溶液的浓度为1.0%。

[0016] DiO是一种亲脂性的荧光染料,可以用来染细胞膜和其它脂溶性生物结构。DiO荧光染料进入细胞膜后,DiO在整个细胞膜上扩散,最佳浓度时可以使整个细胞膜染色。DiO在进入细胞膜之前荧光非常弱,当与细胞膜结合后其荧光强度大大增强,DiO被激发后可以发出绿色的荧光,具有很高的淬灭常数和激发态寿命。可以用标准的FITC滤光片检测。

[0017] DiO通常不会明显影响细胞的生存力(viability),因此被广泛用于正向或逆向的,活的或固定的神经等细胞或组织的示踪剂或长期示踪剂(long-term tracer)。除了最简单的细胞膜荧光标记外,还可以用于检测细胞的融合和粘附,检测发育或移植过程中细胞迁移,通过FRAP(Fluorescence Recovery After Photobleaching)检测脂在细胞膜上的扩散,检测细胞毒性和标记脂蛋白等。

[0018] 本发明为了避免血样中血红色的干扰,优选DiO荧光染料,利用其在484nm的激发光下能够发射501nm的发射绿色荧光的原理,实现红细胞细胞膜的荧光标记检测。

[0019] 在本发明应用较佳的实施例中,上述试纸条外端组装有卡壳,卡壳下方开设有加样孔。

[0020] 一种检测人ABO血型试纸条的制备方法,包括如下步骤:

[0021] (1) 提供吸水纸、包被有抗A、抗B和抗RBC的硝酸纤维素膜以及铺设有溶血剂和细胞膜荧光染料的样品垫;

[0022] (2) 将吸水纸、硝酸纤维素膜以及所述样品垫依次铺设在聚酯板上,以形成检测试纸条大板。

[0023] 在本发明应用较佳的实施例中,上述步骤(2)还包括,将检测试纸条大板用切刀机分切成预设规格的试纸条初品,将所述试纸条初品与对应规格的带有加样窗口的卡壳组装形成检测人ABO血型试纸条。

[0024] 在本发明应用较佳的实施例中,上述步骤(1)中硝酸纤维素膜上的抗体包被采用包被缓冲液进行包被,抗体包被的浓度为1-5mg/mL,包被缓冲液包括磷酸缓冲液和蔗糖,磷酸缓冲液的浓度为10-50mmol,pH为7.2-7.5,蔗糖的浓度为0.8-1.5%;

[0025] 优选的,磷酸缓冲液的浓度为30mmol,pH为7.5,蔗糖的浓度为1%。

[0026] 一种使用上述试纸条的检测人ABO血型的方法,包括如下步骤:在加样孔中加入全血样本5-10μL,待样本与样品垫充分接触后,滴加1-3滴10mmol,pH7.4的PBS样本冲洗液,

12-15分钟后,在484nm波长下的激发光下,即可检测到501nm发射光信号。

[0027] 在本发明应用较佳的实施例中,上述检测方法包括将试纸条插入配套的免疫荧光检测仪进行检测。

[0028] 一种人ABO血型检测试剂盒,包括试纸条和样本冲洗液。

[0029] 本发明实现血型ABO检测的原理为:当待测血样从加样孔上滴加至样品垫上后,样品垫上的溶血剂Triton X-100破坏细胞膜的通透性并且破碎细胞膜,从而使血样红细胞上的凝集原A、凝集原B和Rh抗原更容易与抗体结合。DiO荧光染料在细胞膜通透性改变后,能够更快的进入细胞膜,凭借DiO荧光染料的脂溶性特性在细胞膜上快速扩散,标记。此时,DiO荧光染料标记后的待测破碎红细胞膜沿层析方向进入预先包被好抗A、抗B和抗RBC的硝酸纤维素膜,若待测血样为A型血,则破碎血样红细胞膜上的凝集原A与硝酸纤维素膜上的抗体A特异性结合,过量的破碎红细胞膜上的凝集原A与硝酸纤维素膜上的抗RBC抗体特异性结合,这样血样中含有凝集原A的破碎红细胞膜就被锚定于硝酸纤维素膜上抗A抗体和抗RBC抗体形成的抗A检测线和抗RBC质控线上,而待测血样A型血红细胞膜上由于不含凝集原B,所以硝酸纤维素膜上抗B抗体的检测线上无法锚定相应的抗原,也没有DiO荧光染料标记的破碎红细胞膜停留于抗体B的检测线。过量的待测血样经过硝酸纤维素膜时,滴加样本冲洗液,利用吸水纸将过量的待测血样从硝酸纤维素膜上吸收,12-15分钟后,通过484nm波长的激发光激发DiO荧光染料发生电子能级跃迁,在501nm波长处有最大检测发射峰,在免疫荧光检测仪上可以观测到抗A检测线和抗RBC质控线有绿色荧光,而抗B检测线上无绿色荧光。若待测血样为B型,则在免疫荧光检测仪上可以观测到抗B检测线和抗RBC质控线有绿色荧光,而抗A检测线上无绿色荧光;若待测血样为AB型,则在免疫荧光检测仪上可以观测到抗A、B检测线和抗RBC质控线有绿色荧光;若待测血样为O型,则在免疫荧光检测仪上可以观测到抗RBC质控线有绿色荧光,而抗A、B检测线上无绿色荧光。

[0030] 长链二烷基羰花青化合物是一类亲脂性荧光染料家族,包括DiO,DiR,DiI和DiA。

[0031] 在其他实施例中,细胞膜荧光染料还可以是DiI,即DiIC₁₈(3),1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanineperchlorate,呈现橙红色荧光。DiI是一种亲脂性膜染料,进入细胞膜后可以侧向扩散逐渐使整个细胞的细胞膜被染色。

[0032] DiI在进入细胞膜之前荧光非常弱,仅当进入到细胞膜后才可以被激发出很强的荧光。DiI被激发后可以发出橙红色的荧光,其中,最大激发波长为549nm,最大发射波长为565nm。

[0033] 此外,在其他实施例中,上述荧光染料还可以用其他颜色染料替换,使用颜色染料可以直接采用目测判断或配套仪器判定。

[0034] 本发明具有以下有益效果:

[0035] 本发明提供一种检测人ABO血型试纸条的制备方法,通过该制备方法能制备出血型检测配套试剂不需低温保存,操作简单,灵敏度高的试纸条。本发明的还提供一种检测人ABO血型的试纸条,该试纸条可以在15分钟内在一根试条上完成多个抗原项目的联合检测,操作简便快捷,对操作人员专业技术水平要求低,适合于临床检测,快速获得检测结果。本发明还可配合仪器检测,避免人为判读带来的误判。本发明还提供了一种检测人ABO血型的试纸条的检测方法,该检测方法操作简便快捷,对操作人员专业技术水平要求低。此外,本发明还提供了一种检测人ABO血型检测试剂盒,该试剂盒检测灵敏度高,可以配合仪器检

测,避免人为判读带来的误判。本发明还设有质控线,可以很好的质控试条的有效性。

附图说明

[0036] 为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案,下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍,应当理解,以下附图仅示出了本发明的某些实施例,因此不应被看作是对范围的限定,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他相关的附图。

[0037] 图1为试纸条的三维结构示意图;

[0038] 图2为试纸条裁剪后的三维结构示意图;

[0039] 图3为试纸条的俯视图。

[0040] 图标:100-吸水纸;200-聚酯板;300-硝酸纤维素膜;400-样品垫;500-卡壳;510-加样孔;520-检测A线;530-检测B线;540-质控线;600-试纸条。

具体实施方式

[0041] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0042] 以下结合实施例对本发明的特征和性能作进一步的详细描述。

[0043] 实施例1:

[0044] 检测人ABO血型试纸条的制备并用于检测人血样ABO血型。

[0045] (1) 在硝酸纤维素膜上预先包被抗A、抗B、抗RBC(做为质控线)。

[0046] 参照图1所示,裁剪出2.5cm*30cm大小的硝酸纤维素膜300,用包被缓冲液配制3mg/ml的抗体A和抗体B溶液,将包被缓冲液包括30mmol磷酸缓冲液(PH=7.5),1%蔗糖,浓度为3mg/ml的抗A、抗B和抗RBC溶液分别线状点样作为检测线,抗A的检测线A 520离硝酸纤维素膜300下边缘6mm,抗B的检测线B 530离硝酸纤维素膜300下边缘10mm,在硝酸纤维素膜300的另一端线状点3mg/ml的抗RBC作为质控线540。

[0047] (2) 样品垫的制备

[0048] 参照图1所示,裁剪出2cm*30cm大小的玻璃纤维样品垫400,在玻璃纤维样品垫400上铺装3mL的溶血剂,溶血剂由0.1%Triton-100水溶液组成,在3mL的溶血剂中添加30μL的1%细胞膜荧光染料长链二烷基羰花青化合物DiO水溶液,混匀后放于37℃烘箱烘干。

[0049] (3) 试纸条的组装

[0050] 分别裁剪出8cm*30cm大小的聚酯板200和4cm*30cm大小的吸水纸100,参照图1所示,将吸水纸100的下边缘与聚酯板200上边缘搭结,在聚酯板200上沿层析方向依次装上样品垫400和装好检测线和质控线540的硝酸纤维素膜300,且硝酸纤维素膜300的上边缘与吸水纸100的下边缘搭接,硝酸纤维素膜300的下边缘与样品垫400的上边缘粘接。

[0051] 参照图2和图3所示,将检测试纸条600大板用切刀机分切成4mm*8cm规格的检测试纸条600,最后在试纸条600外端装上开有加样孔510的卡壳500,组装为试纸条600。

[0052] (4) 检测与结果判断

[0053] 检测:取待测血液样本5 μ L,从试纸条600的加样孔510中加入试纸条600,待血液样本与样品垫400充分接触接触后(大约在上样后10s),滴加3滴10mmol, pH7.4的PBS样本冲洗液,15分钟后,将试纸条600插入配套的免疫荧光检测仪进行检测。设置免疫荧光检测仪的激发波长为484nm,检测波长为501nm。

[0054] 结果判断:参照表1所示,+表示在484nm激发光下有501nm波长的发射光信号;-表示在484nm激发光下无501nm波长的发射光信号。若检测线A 520和质控线540均有检测到501nm波长的发射光信号,而检测线B 530未检测到501nm波长的发射光信号,则待测血型为A型。若检测线B 530和质控线540均有检测到501nm波长的发射光信号,而检测线A 520未检测到501nm波长的发射光信号,则待测血型为B型。若检测线A 520、检测线B 530和质控线540均有检测到501nm波长的发射光信号,则待测血型为AB型。若质控线540有检测到501nm波长的发射光信号,而检测线A 520和检测线B 530未检测到501nm波长的发射光信号,则待测血型为O型。若质控线540未检测到501nm波长的发射光信号,则判断结果不可靠或样本中无血型抗原。

[0055] 表1血型判断标准

检测线 A	检测线 B	质控线	结果判断
+	-	+	A 型
-	+	+	B 型
+	+	+	AB 型
-	-	+	O 型
+/-	+/-	-	结果不可靠或样本中无血型抗原

[0057] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

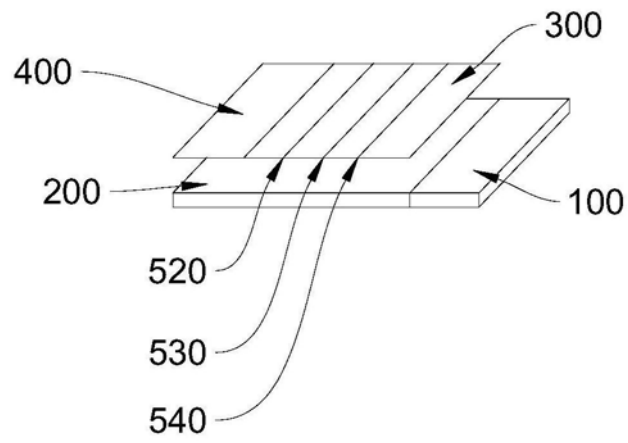
600

图1

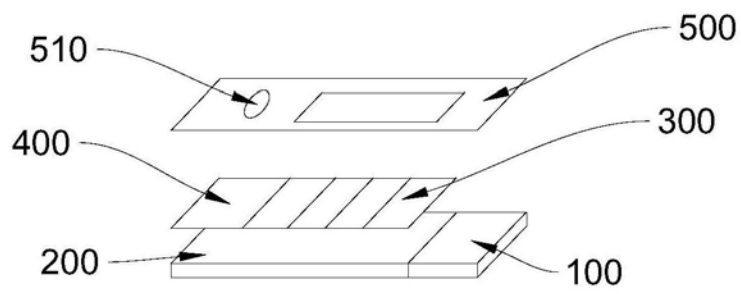
600

图2

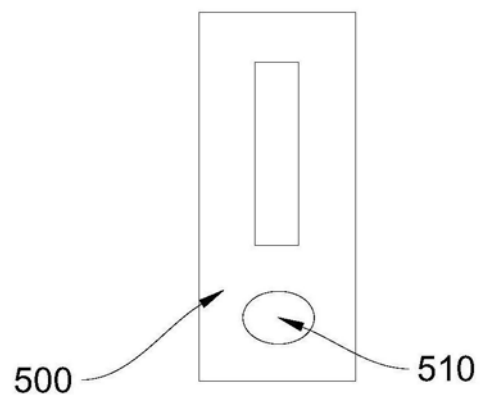


图3

专利名称(译)	一种检测人ABO血型试纸条、制备方法、检测方法及应用		
公开(公告)号	CN109917141A	公开(公告)日	2019-06-21
申请号	CN201910210018.7	申请日	2019-03-19
[标]发明人	钟乾兴 肖江群 王保丹		
发明人	钟乾兴 肖江群 王保丹		
IPC分类号	G01N33/80 G01N33/533 G01N33/558 G01N21/64		
代理人(译)	曹桓		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种检测人ABO血型试纸条、制备方法、检测方法及应用，生物医药领域，包括聚酯板以及与聚酯板上边缘粘结的吸水纸，在聚酯板上表面沿层析方向依次铺设样品垫和预先包被好抗A、抗B和抗RBC的硝酸纤维素膜，且硝酸纤维素膜的上边缘与吸水纸的下边缘搭接，样品垫上铺设溶血剂和细胞膜荧光染料。本发明提供一种检测人ABO血型试纸条的制备方法，通过该制备方法能制备出血型检测配套试剂不需低温保存，操作简单，灵敏度高的试纸条。此外，还提供一种检测人ABO血型的试纸条，该试纸条可以在短时间内完成多个抗原项目的联合检测，操作简便快捷，对操作人员专业技术水平要求低，适合于临床检测，快速获得检测结果。

